鳞翅目昆虫肠道微生物的多样性及其与宿主的相互作用

陈勃生，鲁兴萌，邵勇奇*

(浙江大学蚕蜂研究所，杭州 310058)

摘要：作为地球上数量最多的动物群体，昆虫种类繁多、形态各异，其肠道内也栖息着大量的微生物，这些微生物直接或间接对宿主发挥着重要的作用，如参与消化、吸收利用营养物质、合成信息素，同时在抵御外来病原的侵入与定殖、提高宿主免疫活性的过程中也起着关键作用。鳞翅目是昆虫纲中仅次于鞘翅目的第二大目，其中既有严重危害农作物的害虫，又有能够授粉和产生经济效益的益虫，对生态系统和人类影响深远。近年来，随着新方法、新技术在肠道微生态学上的应用，国内外鳞翅目昆虫肠道微生物的研究也日趋热烈。本文将围绕家蚕 *Bombyx mori*、海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 等几种代表性鳞翅目昆虫，介绍目前为止针对鳞翅目昆虫肠道微生物组的研究，包括肠道的内环境、微生物的多样性及其研究方法，随后对已明确的鳞翅目昆虫肠道微生物的组成，以及共生菌具体对宿主代谢解毒、免疫健康等方面做出的贡献进行分析，以期为进一步深入探究鳞翅目昆虫肠道微生物打下基础，以及转化这些知识来控制害虫(海灰翅夜蛾、小菜蛾等)，促进益虫(家蚕等)生长，确保农业和经济更好地发展。

关键词：鳞翅目昆虫；肠道；肠道微生物；肠道内环境；多样性；协同进化

中图分类号：Q965.8　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2017)06-0710-13

Diversity of the gut microbiota in lepidopteran insects and their interaction with hosts

CHEN Bo-Sheng, LU Xing-Meng, SHAO Yong-Qi* (Institute of Sericulture and Apiculture, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: Insects, the largest group of multicellular organisms on the Earth, are notable for their numerous species and varied morphology, generally harboring abundant microbes in their digestive tract. These microorganisms help the host in digestion, nutrition absorption, pheromone synthesis, as well as playing a role in the defense of harmful invaders, which strengthen the host immune activity. Lepidoptera is the second largest order in Insecta, with many common pest and beneficial insect species. Many methods and techniques have been developed for the research on the gut microbiota, which becomes a hot research topic in recent years. This review outlines the research of gut microbiota in lepidopteran insects (*e.g.*, *Bombyx mori*, *Spodoptera littoralis* and *Plutella xylostella*), including gut environment, microbial diversity and research methods. Furthermore, the community structure of several lepidopteran model insects and the roles of gut microbes in host's detoxification and immune system are summarized. The findings we review here should be valuable for the further research on the gut microbiota in lepidopteran insects, and pave the way for developing novel strategies to control pests and protect beneficial insects.

Key words: Lepidopteran insect; gut; gut microbiota; gut environment; diversity; coevolution

---

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目(31601906)；浙江大学“百人计划”；中央高校基本科研业务费专项资金(2017QNA6024)

作者简介：陈勃生，男，1992 年 3 月生，山西大同人，博士研究生，研究方向为昆虫微生物组，E-mail：369696542@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yshao@zju.edu.cn

收稿日期 Received：2016-12-29；接受日期 Accepted：2017-05-10

作为占生物圈内动物总数一半以上的群体，昆虫的活动范围十分广泛，它们凭借强大的繁殖能力、迁徙能力以及对环境的适应力，对生物圈内包括人类在内的各种生物产生了深远的影响（Robinson *et al.*, 2011）。如蜜蜂、蝶类和蛾类是自然界重要的授粉昆虫；粪金龟科（Geotrupidae）中金龟亚科（Scarabaeinae）的昆虫收集其他动物的粪便作为其幼虫的食物，是自然界典型的分解者。而双翅目的冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 常携带疟原虫属的病原，能够在吸食其他动物血液的同时传播疟疾；鳞翅目夜蛾科（Noctuidae）的海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 则是一种危害极大的农业害虫，其幼虫啃食大量植物叶片，造成农作物减产（Boukedi *et al.*, 2017；Mint Mohamed Lemine *et al.*, 2017）。此外，还有一些具有重要经济价值的昆虫，如家蚕 *Bombyx mori*，大规模饲养家蚕可提供丝绸等产业的原料，养蚕业也是我国在世界农业中少有的优势产业之一。

微生物，包括细菌（bacterium）、古生菌（archaea）、真菌（fungus）以及大部分原生动物（protozoa）和病毒（virus），它们在自然界中广泛分布，维持着生态平衡。动物和微生物生活在一起，动物的体表、体节间隙、消化道、组织甚至细胞内都有微生物聚集。特别是在肠道内，此处微生物密度极高，代谢旺盛，与动物宿主的健康和疾病密切相关，正常肠道菌群甚至被视为一种独立的“器官”而增加整个机体的适应性（O’Hara and Shanahan, 2006）。从肠道环境中挖掘的微生物菌株在生物技术上也被广泛应用，可以作为分解纤维素和木质素等原料的酶的来源。目前肠道微生物研究正成为国际关注的焦点问题。作为昆虫纲第二大目，鳞翅目昆虫的数量约占昆虫总数的 16%，农、林业害虫种类多，同时又包括具有授粉能力和经济效益的昆虫，在昆虫学研究中极具代表性（Guarner and Malagelada, 2003）。鳞翅目昆虫肠道微生物的多样性与宿主的关系，及其在昆虫资源与保护中的角色正受到国内外研究人员的广泛关注和重视。面对这些数量庞大且关系错综复杂的肠道微生物群体，通过尝试多种方法探究其分布、组成和作用，近年来取得了许多重要成果。本文作者将围绕家蚕 *B. mori*、海灰翅夜蛾 *S. littoralis*、小菜蛾 *Plutella xylostella* 等几种代表性鳞翅目昆虫，介绍针对鳞翅目昆虫肠道微生物的研究，包括肠道的内环境、微生物多样性及其研究方法，之后分析了目前已确定的鳞翅目昆虫肠道微生物的组成，以及共生菌对宿主代谢解毒、免疫健康等方面做出的贡献。这些最新的研究进展极大地促进了鳞翅目昆虫肠道微生物组的研究。关于其他目昆虫肠道微生物的研究，此前已有不少专题综述发表（高秀云等, 2008；Tang *et al.*, 2010；Xie *et al.*, 2012；Bing *et al.*, 2013；Berlanga, 2015；Brune and Dietrich, 2015；Diouf *et al.*, 2015；Rossmassler *et al.*, 2015；Alberoni *et al.*, 2016），故不在本篇综述的讨论范围内。

1　鳞翅目昆虫的肠道结构及环境

1.1　鳞翅目昆虫的肠道结构

目前，针对鳞翅目幼虫消化系统的研究较多，相比双翅目、鞘翅目和膜翅目等其他昆虫，鳞翅目昆虫幼虫消化道结构十分简单，没有大型的嗉囊和复杂的盘绕结构，主要分成前肠、中肠和后肠 3 个部分（图 1）（Engel and Moran, 2013）。前肠和后肠由外胚层发育而成，会随着蜕皮过程脱落，中肠则由内胚层细胞形成。整个肠道在幼虫的皮下覆盖呈圆筒状，从外口器开始，连接着十分短小的食道，经过幽门之后即是幼虫的前肠，前肠用来储存仍未进入中肠消化的食物。食物通过贲门后，即进入消化的主要部位——中肠，中肠由杯状细胞（goblet cell）和柱状细胞（columnar epithelial cell）组成。杯状细胞主要分泌肠道粘液，柱状细胞能够分泌消化酶，其表面形成微绒毛（microvilli），便于吸收营养成分。中肠内部还有一层十分重要的膜状结构，即围食膜（图 1）。覆盖昆虫肠道内部的围食膜是一层由几丁质和蛋白结合而成的无色、透明的半透膜结构。其中包含糖蛋白和蛋白聚糖，α，β 和 γ 3 种不同构型的几丁质也在围食膜中发现（Wang and Granados, 2001）。这些几丁质和蛋白质成分能够稳定结合，形成多层的网状结构，如方格形网状结构和蜂巢形网状结构（Mercer and Day, 1952）。根据其分泌方式和结构等特征，围食膜又分为两种：第 1 种由中肠通过连续分泌形成多层结构，这种围食膜在大多数昆虫肠道内存在，如鳞翅目、鞘翅目、膜翅目、直翅目、脉翅目、蜻蜓目等；第 2 种在昆虫贲门附近，由前肠末端或中肠前端的细胞分泌，这种围食膜仅有2 ~ 3 层，常存在于一些较古老的昆虫肠道内，但也在一些双翅目和鳞翅目昆虫中发现（Lehane, 1997；Hegedus *et al.*, 2009）。围食膜的主要功能是将食物和中肠细胞隔离，避免脆弱的中肠细胞被食物损伤，同时还具有隔离病原微生物的能力。围食膜分泌能力的降低会导致昆虫更容易被病原菌入侵，提高其

死亡率(Kuraishi *et al*., 2011)。此外,由于围食膜的存在,肠道被分为两个部分,即围食膜内区域以及肠道上皮细胞和围食膜之间的区域,这两个区域内分布着不同的消化酶,使昆虫的消化过程通过多步完成(Richards and Richards, 1977; Terra *et al*., 1979)。在对家蚕肠道围食膜的研究中,共发现了305 种蛋白质,这些蛋白具有对几丁质和有毒物质的结合能力,其活性主要与物质结合(binding activity)和食物消化(digestive activity)能力相关(Hu *et al*., 2012; Zhong *et al*., 2012)。中肠末端通过幽门与后肠连接,后肠是水分、离子等回收的场所,剩余的食物残渣在此处形成粪便,经肛门排出。这种结构有利于幼虫的大量进食,提高食物的消化速率。

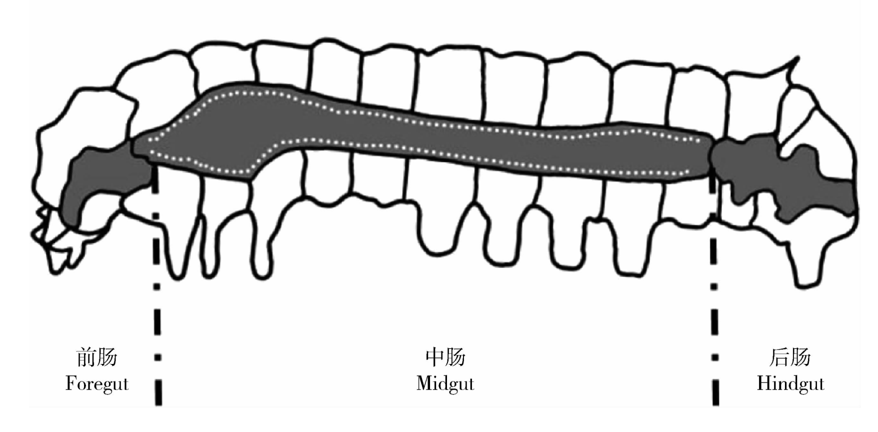


图 1 鳞翅目昆虫幼虫肠道典型结构

Fig. 1 Typical gut structure of the lepidopteran larva

1.2 鳞翅目昆虫的肠道内环境

影响肠道内微生物生长的主要因素包括 pH 值、氧含量、氧化还原条件和离子浓度等,部分鳞翅目昆虫肠道内环境参数见表 1。鳞翅目幼虫肠道普遍呈碱性,一般情况下,中肠碱性最强,前肠和后肠的碱性相对较弱(Dow, 1992)。这种碱性环境由其肠道杯状细胞内的质子泵(V-ATPase)不断运输氢离子造成的氢离子梯度形成(Gomes *et al*., 2013),有利于促进肠道内部分酶促反应的进行(Berebaum, 1980)。与之相类似,pH 能对肠道内共生菌的繁殖产生影响(Rousk *et al*., 2009),因此碱性环境是影响肠道微生物分布的重要因素。此外鳞翅目昆虫的肠道普遍呈低氧状态(Johnson and Barbehenn, 2000),这与肠道的半密封环境和肠道内需氧微生物的消耗有关。

2 鳞翅目昆虫肠道微生物的研究方法

针对微生物的研究,始于培养法,肠道微生物也不例外。通过含有特定物质的选择性培养基能够将不同的菌种分离,之后借助分子生物学方法或根据菌株的各种特性比对特征库,确定微生物的种属(Hernandez *et al*., 2015)。利用选择性培养基还可以鉴别其特定功能,例如筛选能够降解羧甲基纤维素、木聚糖或者淀粉的菌株(Anand *et al*., 2010)。然而,由于微生物正常生长所需的营养物质复杂多样,绝大多数微生物目前难以进行人工培养(Torsvik *et al*., 1990)。在对舞毒蛾 *Lymantria dispar* 肠道微生物的研究中,使用培养法鉴定出的菌种只占测序法鉴定出菌种的 47%(Broderick *et al*., 2004)。因此,尽管在微生物特性的研究中具有效果直观的特点,用培养法进行微生物多样性研究不能准确反映样品中微生物的组成情况。

2.1 基于电泳技术的微生物多样性研究方法

目前分子生物学鉴定微生物的方法被广泛使用,即利用细菌 16S rRNA 基因序列、真菌 18S rRNA 基因或转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列进行较准确的分类。这些序列中的可变区能够有效地区别不同的微生物。在菌群多样性研究中,常常以这些分子标记为基础进行限制性片段长度多态性(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)、变性梯度凝胶电泳/温度梯度凝胶电泳(denatured/temperature gradient gel electrophoresis, DGGE/TGGE)、核糖体 DNA 扩增片段限制性内切酶分析(amplified rDNA restriction analysis, ARDRA)等方法进行鉴定。T-RFLP法需要设计一

表 1　部分鳞翅目昆虫中肠内环境

Table 1　Internal environment of lepidopteran insect midgut

所属科 Family	物种 Species	食性 Phytophagy	pH 范围 pH range	氧化还原电势[a] Potential redox (mV)	氧分压[b] Partial pressure of oxygen (mm Hg)	参考文献 References
螟蛾科 Pyralidae	米螟 *Corcyra cephalonica*	专食 Monophagus	7.0 – 7.6 8.9 – 9.1	–	–	Srivastava and Krishna, 1976 Srivastava and Mathur, 1966 Berenbaum and Jan, 1980
菜蛾科 Plutellidae	小菜蛾 *Plutella xylostella*	专食 Monophagus	7.4 – 7.9 8.29	–	–	Srivastava and Mathur, 1966 Narayanan *et al*., 1976
	棉铃虫 *Heliothis armigera*	专食 Monophagus	7.8 – 8.0 8.32	–	–	Grayson, 1951 Narayanan *et al*., 1976
夜蛾科 Noctuidae	斜纹夜蛾 *Spododtera litura*	杂食 Polyphagus	8.2 – 8.5	–	–	Narayanan and Jayaraj, 1974
	海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis*	杂食 Polyphagus	8.7 – 10.8	–	–	Darvishzadeh *et al*., 2014
凤蝶科 Papilionidae	虎凤蝶 *Papilio glaucus*	杂食 Polyphagus	10.0	41	0 ± 0	Appel and Martin, 1990; Johnson and Barbehenn, 2000
天蛾科 Sphingidae	烟草天蛾 *Manduca sexta*	专食 Monophagus	9.6 10.8	– 188	1.2 ± 0.4 (A)	Waterhouse, 1949; Appel and Martin, 1990 Johnson and Barbehenn, 2000
蚕蛾科 Bombycidae	家蚕 *Bombyx mori*	专食 Monophagus	9.0 – 9.8 9.4 – 10.3 11.0	–	–	Waterhouse, 1949 Hemipel, 1955 Liu *et al*., 2016
蛱蝶科 Nymphalidae	黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus*	杂食 Polyphagus	7.2 – 8.4	54	1.3 ± 0.9 (A) 0.7 ± 0.6 (P)	Appel and Martin, 1990; Johnson and Barbehenn, 2000
毒蛾科 Lymantriidae	舞毒蛾 *Lymantria dispar*	杂食 Polyphagus	8.1 10.2	214	1.5 ± 0.7(A) 5.1 ± 2.2(P)	Appel and Martin, 1990 Johnson and Barbehenn, 2000
	白斑毒蛾 *Orgyia leucostigma*	杂食 Polyphagus	9.69 – 9.91	– 3	6.1 ± 0.7 (A) 2.2 ± 0.4 (P)	Barbehenn and Martin, 1994; Johnson and Barbehenn, 2000
枯叶蛾科 Lasiocampidae	森林天幕毛虫 *Malacosoma disstria*	杂食 Polyphagus	10.16 – 10.30	– 30	4.0 ± 0.6 (A) 3.6 ± 0.6 (P)	Barbehenn and Martin, 1994; Johnson and Barbehenn, 2000

[a] Gross *et al*., 2008; [b] Johnson *et al*., 2000. A：中肠前端 Anterior midgut；P：中肠末端 Posterior midgut；–：目前尚未测定 Not measured yet.

对针对特定序列的引物，其 5′端具有荧光标记，使用这种引物进行 PCR 扩增后，再用特定的内切酶切断反应产物，经电泳后观测荧光强度，由于含有荧光的序列被切断成不同的长度，因此在扫描图谱上可以看到不同的峰，即代表不同种属的微生物（Husband *et al*., 2002；Broderick *et al*., 2004）。与 T-RFLP 相似，ARDRA 利用内切酶切断特定序列的 PCR 扩增产物，之后使用高分辨率的琼脂胶电泳进行微生物群落分析，这种方法更加适用于已经成功分离的菌种，能够一次性判断大量菌株的种属是否存在差别（Sklarz *et al*., 2009）。使用 DGGE 法需含有变性剂的凝胶，从上样孔开始，变性剂的浓度不断升高，不同的扩增产物含有不同的碱基序列，因此变性所需的变性剂浓度不同，当某条序列电泳至其恰好变性的浓度时，双链结构被部分破坏，在凝胶中电泳的速度减慢，通过这种原理就能够将序列不同的扩增片段分离开来，获得菌群多样性的信息。Lin 等（2015）在对小菜蛾肠道微生物的研究中使用了 PCR-DGGE 的方法，成功获得 15 个不同的条带，并鉴定出 7 个属的细菌。

2.2　基于高通量测序技术的微生物多样性研究方法

随着 DNA 测序技术的飞速发展，新一代测序技术由于具备边扩增边测序的特性，简化了微生物多样性研究。二代测序技术在细菌多样性研究中能够扩增出样品中绝大多数的 16S rRNA 基因序列，通

过对测序所得的序列进行筛选和聚类，再与细菌常用数据库（如 Silva，Greengenes 和 RDP）或专用数据库，如针对网翅目昆虫的 DictDb 数据库（Mikaelyan *et al.*，2015）进行比对，即可获得样品中微生物的种属信息，还可以进一步确定各种菌类所占比例、进行功能预测等分析。若要对微生物功能进行更加深入的研究，宏基因组测序（metagenomic sequencing）是较好的方法之一，此方法不局限于特定基因的序列，可以对样品中所有的 DNA 序列进行测序。序列拼接后进行聚类分析及数据库比对，能够较全面地分析肠道菌群的具体组成和功能，目前较常用的功能比对数据库有 Nr 库，EggNOG 库，KEGG 库和 CAZy 库等（Tatusov *et al.*，1997；Kanehisa and Goto，2000；Benson *et al.*，2006；Lombard *et al.*，2014）。在进行此类测序研究时，核酸质量十分重要。由于昆虫的食物各异，因此在样品采集时往往要尽量去除与微生物测序无关的物质，例如破碎的宿主组织、植食性动物肠道中的植物组织等。杂质的去除方法多样，针对含植物组织的处理，可以采用低/高速交替离心的方法：组织破碎后使用双层纱布过滤，之后低速离心（200 × g，5 min），收集上清后自然沉降，再将上清高速离心（5 000 × g，10 min），收集沉淀并重悬，重复低/高速 3 ~ 5 次后用沉淀提取核酸（Wang *et al.*，2008）。如果是内含颗粒物极少的液体样品，则可以采用滤膜过滤的方法：先将液体用 0.8 μm 滤膜过滤，之后采用 0.22 μm 滤膜过滤，将过滤后的滤膜作为样品提取 DNA 用于测序（Venter *et al.*，2004）。如果样品中含有动物组织块，则最好进行预处理：样品破碎后使用含胰蛋白酶的缓冲液将其悬起，37℃ 处理 30 min，用牛血清蛋白（bovine serum albumin，BSA）终止反应，之后交替进行低/高速离心并重复几次，最后用沉淀提取 DNA 进行测序（Liu *et al.*，2011）。使用 Percoll 密度梯度离心能够获得较纯的微生物，但相应损失也较大，故需准备大量样品。

2.3 基于稳定同位素标记的肠道微生物活性研究方法

值得注意的是大部分从食物和外部环境进入肠道的微生物不能在肠道定殖，甚至因为昆虫肠道内环境的选择压力，例如极端 pH 值（鳞翅目幼虫肠道 pH 可以达到 10，反之果蝇中肠 pH 仅为 3 ~ 4）及消化酶的作用而死亡，但是这些大量却没有功能的细菌仍然被传统宏基因组学方法鉴定。另外一方面，肠道细菌的代谢活性随着宿主发育和环境影响不断变化，在复杂的菌群中，很难确定究竟是哪些微生物协助宿主消化食物中难降解成分。找出真正参与肠道代谢的微生物正成为迫切需要解决的关键问题。虽然新一代高通量测序技术具有高通量和高分辨率的特点，可以更精准地检测低丰度微生物，为菌群研究的快速发展奠定了基础，但仅依靠测序技术把菌群的组成（membership）与其相应功能（function）直接联系起来存在难度，因此需要不断引进其他实验技术来推进肠道菌群的深入研究。理论上采用稳定同位素示踪技术（stable isotope labeling，SIP）可以区分肠道菌群中不同组成参与的功能。SIP 是一种利用重同位素或其标记化合物指示和追踪相应元素或化合物在生物体及其环境介质中迁移、转化和积累的方法。因为重同位素或轻同位素组成的化合物具有相同的生物学特性，微生物可利用稳定性重同位素如^{13}C 标记底物生长繁殖。应用稳定性重同位素标记，可以将特定的物质代谢过程与复杂的环境微生物群落物种组成直接耦合，揭示复杂环境样品中同化稳定性重同位素标记底物的微生物作用者。稳定性同位素示踪微生物技术是环境微生态学研究中的有力工具（Radajewski *et al.*，2000），然而应用于肠道菌群领域尚处于起步阶段，是值得探索的新兴研究方向。Shao 等（2014）将第二代测序技术（pyrosequencing，Pyro）和 SIP 结合起来，即 Pyro-SIP（图 2），初步检测了海灰翅夜蛾 *S. littoralis* 肠道中活跃肠道细菌。葡萄糖是海灰翅夜蛾肠道内最重要的营养物质，也是微生物生长繁殖的能源物质，因此^{13}C 标记的葡萄糖被混入人工饲料饲喂海灰翅夜蛾，其肠道内有代谢活性的微生物就会利用此^{13}C 底物为碳源生长，并将^{13}C 同化为自身的基本构成包括脂肪酸、蛋白质及核酸等。核酸携带着遗传信息，提取样品中微生物组总 DNA 或 RNA，并通过超高速密度梯度离心，可将^{13}C 标记的 DNA 或 RNA 与未标记的^{12}C 核酸有效分离。代谢活性高的微生物的核酸由于含有大量的^{13}C 而处于下层位置，对这些^{13}C 标记的核酸分层取样并进行测序即可得到海灰翅夜蛾肠道内的具有代谢活性的微生物的分布情况。Pyro-SIP 揭示了一个相对简单但独特的肠道菌群与宿主协同发展的现象，菌群代谢活性和组成在幼虫阶段持续变化（Shao *et al.*，2014）。此外，通过提取肠道 RNA，并进行反转录，将这些 cDNA 进行测序，也能够去除无活性细菌的干扰，但是其不如 SIP 技术灵敏（Brinkmann *et al.*，2008）。

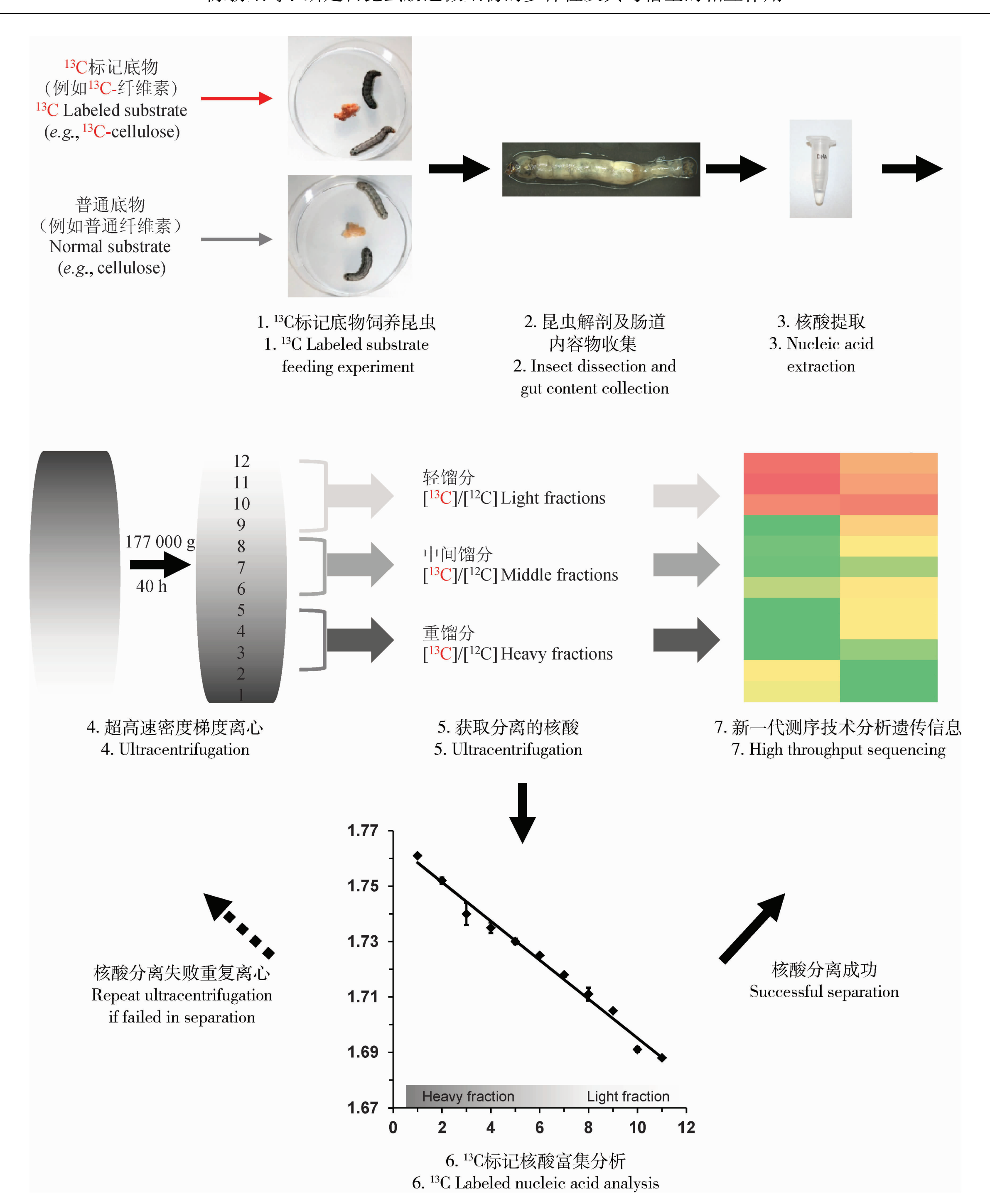


图 2　稳定性同位素示踪肠道微生物的研究方法（Pyro-SIP）

Fig. 2　Outline of a modified Pyro-SIP experiment for gut microbiota

3　鳞翅目昆虫的肠道微生物多样性

鳞翅目昆虫食性多样，例如海灰翅夜蛾 *S. littoralis* 是杂食性昆虫，以棉花、蔬菜等近 300 多种植物为食，而家蚕为寡食性昆虫，仅适合食桑。肠道微生物多从口入，因此食物上携带的微生物显著影响着肠道菌群。Liang 等（2014）发现，在饲喂莴苣叶的家蚕 4－5 龄幼虫中，肠道微生物和普通家蚕区别较大，莴苣叶饲喂的家蚕 5 龄幼虫肠道中含有大量的不动杆菌属 *Acinetobacter* 和硫酸盐还原菌属 *Anaerofilum* 细菌，而在正常家蚕幼虫肠道内几乎不存在这些细菌。反之，正常家蚕肠道中定居的芽孢杆菌属 *Bacillus* 和弓形杆菌属 *Arcobacter* 在莴苣叶饲

喂的家蚕肠道中没有发现。即使以同一种食物饲喂,由于季节和地理位置的差异导致食物携带的微生物群类的不同,也会导致肠道微生物产生差异(Priya *et al*., 2012)。不同来源的微生物在昆虫肠道经由内环境和各自特性的相互作用,形成相对稳定的微生态环境,某一种共生菌数量发生变化,可以影响整个肠道菌群,甚至出现原本危害可以被忽略的微生物在数量增加之后直接导致宿主死亡的现象(Thakur *et al*., 2015)。

使用 DGGE 法,He 等(2013)在粘虫 *Mythimna separata* 肠道中发现了肠球菌属 *Enterococcus*、泛菌属 *Pantoea*、假单胞菌属 *Pseudomonas* 和葡萄球菌属 *Staphylococcus* 细菌。除肠球菌外,Xiang 等(2006)还在棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 肠道中发现了作为优势菌群的乳球菌属 *Lactococcus*、黄杆菌属 *Flavobacterium* 和寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas* 细菌。结合传统培养、16S rDNA 测序和 T-RFLP 3 种方法,鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*、肠杆菌属 *Enterobacter*、不动杆菌属和拟杆菌属 *Bacteroides* 的细菌也陆续被检测出(Priya *et al*., 2012)。

然而,培养法、DGGE 和 T-RFLP 这些方法能够鉴定的微生物数量有限,利用新一代测序技术,能够获得更加全面的微生物组成信息。在对海灰翅夜蛾肠道微生物的研究中,测得 112 473 条高质量的 16S rRNA 基因序列,包含 36 个优势分类操作单元(operational taxonomic unit, OTU),其中以肠球菌属 *Enterococcus* (42.3%)、梭菌属 *Clostridium* (42.2%)和肠杆菌属 (14.6%)为主(Tang *et al*., 2012)。肠道不同部位的微生物分布也有所不同,前肠以蒙氏肠球菌 *Enterococcus mundtii* 为主,中肠则基本全部是梭菌属,后肠的菌落组成较均匀,主要是蒙氏肠球菌,梭菌和酪黄肠球菌 *Enterococcus casseliflavus*。这种差异可能是由于肠道不同部位的 pH、氧分压等条件的不同造成的。鳞翅目昆虫完全变态发育,经历卵、幼虫、蛹和成虫 4 个阶段,虫体结构差异巨大。我们最近的研究发现,这 4 个阶段的微生物组成也不一样:卵期的微生物由泛菌属 *Pantoea*(53.5%)、不动杆菌属(23.4%)和罗尔斯通菌属 *Ralstonia* (9.2%)组成;肠球菌从幼虫起开始大量繁殖,数量超过菌群总数的一半,而卵期大量存在的泛生菌属则不断减少;幼虫化蛹后,肠球菌占据绝对优势(大于 97%);最后,幼虫羽化后,肠道微生物又因性别不同产生了相当大的差异:雌性成虫肠道以肠球菌属、泛菌属和克雷伯氏杆菌属 *Klebsiella* 为主,雄性成虫则完全不同,其肠道基本全部由克雷伯氏杆菌属细菌占据(Chen *et al*., 2016)。

家蚕肠道菌群则主要由肠球菌属、不动杆菌属、拟杆菌属、假单胞菌属 *Pseudomonas* 以及甲基杆菌属 *Methylobacterium* 的细菌所构成。Sun 等(2016)对家蚕 5 龄幼虫肠道微生物进行了 16S rRNA 基因测序,总共获得 18 803 个可鉴定到属的有效序列,共包含 12 335 个 OTU。其中,数量最多的菌种为肠球菌(雄性 24.75%,雌性 46.89%),其次为代尔夫特菌 *Delftia*(雄性 12.57%,雌性 5.19%)。此外,嗜糖假单胞菌属 *Pelomonas*、罗尔斯通菌属、葡萄球菌属 *Staphylococcus*、不动杆菌属等细菌也在家蚕肠道菌群研究中被报道过(Liang *et al*., 2014)。

在其他鳞翅目昆虫如小菜蛾的肠道中,通过对 16S rRNA 基因进行测序,共获得 342 个 OTU。在目水平上进行分析,发现其中肠杆菌目(Enterobacteriales, 45.17%)、弧菌目(Vibrionales, 22.51%)以及乳杆菌目(Lactobacillales, 29.49%)含量较丰富(Xia *et al*., 2013)。在稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 肠道中,发现了类诺卡氏菌属 *Nocardioides* (2.5%)、硝化螺菌属 *Nitrospira* (1.3%)、玫瑰弯菌属 *Roseiflexus* (1.2%)、鞘脂单胞菌属(1.0%)及拟杆菌属(1.0%)(刘小改等, 2016)。

由此可见,鳞翅目昆虫肠道中,主要以变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)和放线菌门(Actinobacteria)细菌为主。在属水平,优势菌种主要为肠球菌属、肠杆菌属、梭菌属、不动杆菌属、假单胞菌属、泛菌属和芽孢杆菌属。其他目昆虫肠道优势菌群组成有所不同,例如水稻害虫褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 肠道内,含有内共生细菌沃尔巴克氏体属细菌 *Wolbachia*;烟粉虱 *Bemisia tabaci* 肠道中代尔夫特菌属为优势菌群(43%);以木材为食的白蚁 *Nasutitermes arborum* 肠道内则以降解木质纤维素的密螺旋体属 *Treponema* 细菌为主。这些差异取决于宿主昆虫的食物来源和行为特性,从另一个角度显示肠道共生菌与宿主协同进化的关系。

4 鳞翅目昆虫肠道微生物与宿主间的关系

4.1 肠道共生菌参与宿主代谢活动

与其他昆虫相似,鳞翅目昆虫肠道微生物主要的作用是协助宿主代谢、增强宿主的免疫能力和环

境适应性，促进其机体健康（图 3）。因不同食物来源，鳞翅目昆虫肠道内定居一批适应其宿主生存环境的微生物。在以甘蔗为食的小蔗杆草螟 *Diatraea saccharalis* 的肠道中，分离出 5 种能够水解纤维素类化合物的细菌，分别为克雷伯氏杆菌属、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*、微杆菌属 *Microbacterium*、芽孢杆菌属和肠球菌属。将这些细菌在含纤维素（carboxymethylcellulose, CMC）培养基上培养发现，克雷伯氏杆菌水解能力最强，它甚至可以降解甘蔗渣和其他的甘蔗残余废物。而另外几种菌类，如酪黄肠球菌虽然有水解 CMC 的能力，但相对比较弱（Dantur *et al.*, 2015）。克雷伯氏杆菌也被发现在家蚕肠道中具有水解淀粉的能力。通过培养法，发现另外其他 10 种细菌也具有降解 CMC、木聚糖、果胶和淀粉的能力。其中，环状芽孢杆菌 *Bacillus circulans* 能够降解的糖类化合物种类最多，液化沙雷氏菌 *Serratia liquefaciens* 则具有最高的酶活性（Anand *et al.*, 2010）。纤维素和木聚糖都是桑叶中含量较高的成分（分别为 19%～25% 和 10%～40%）（Lohan, 1980），由此可见家蚕肠道微生物对其食物消化的重要性。在以豆科植物为食的黏毛虫 *Anticarsia gemmatalis* 肠道中分离出了具有半胱氨酸和丝氨酸蛋白酶活性的微生物，这些酶类与宿主自身所产生的蛋白酶结构不同（Pilon *et al.*, 2013）。在以蜂蜡为主食（Mohmed *et al.*, 2014）的鳞翅目昆虫印度谷蛾 *Plodia interpunctella* 体内甚至发现了能够降解聚乙烯这类高分子化合物的肠杆菌属和芽孢杆菌属细菌（Yang *et al.*, 2014）。在昆虫的生长过程中，维生素是必不可少的物质，除了经由食物摄入，一些肠道细菌也能够合成维生素，补充食物中维生素的不足（LeBlanc *et al.*, 2013）。

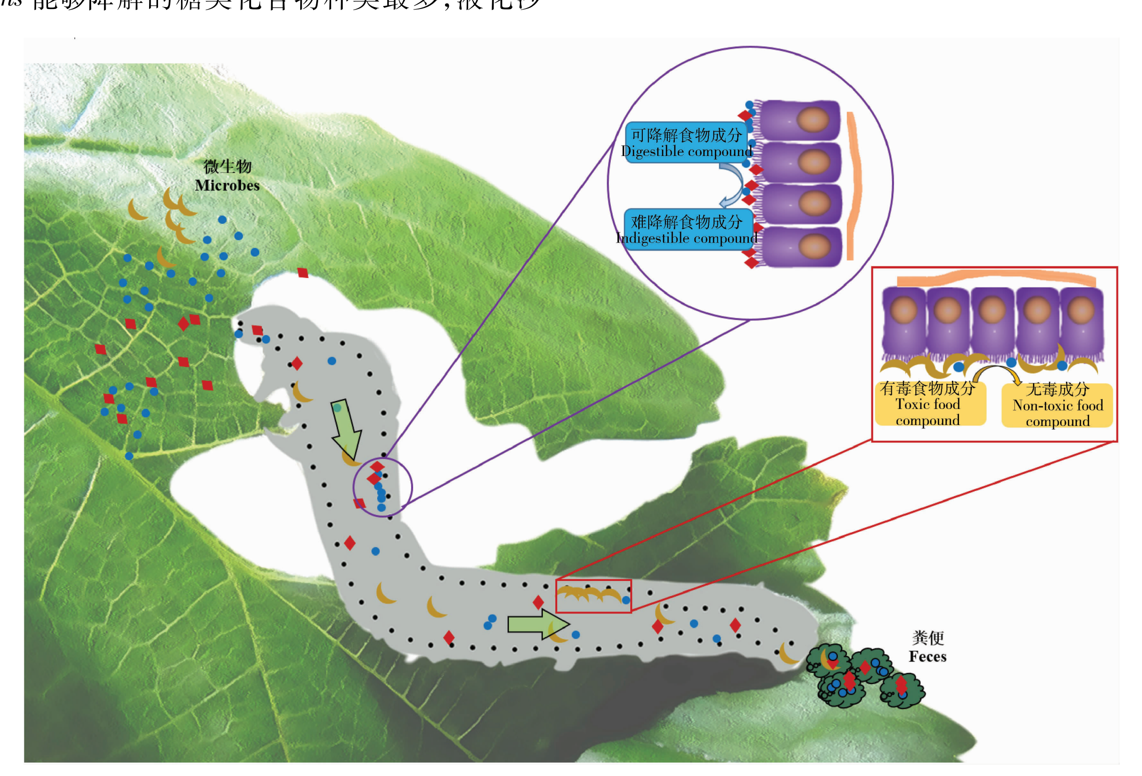


图 3　肠道微生物与鳞翅目昆虫宿主之间的相互作用（改自 Spencer, 1988 和 Ramya *et al.*, 2016）

Fig. 3　Interaction between gut microbes and their lepidopteran hosts (adapted from Spencer, 1988 and Ramya *et al.*, 2016)

除了降解食物中的难消化成分外，肠道共生菌还能协助宿主降解食物中的有毒或有害物质。一些土壤中生存的伯克氏菌属 *Burkholderia* 细菌能够降解有机磷农药杀螟松（fenitrothion），这些微生物定居于点蜂缘蝽 *Riptortus pedestris* 肠道内，可以协助其宿主减弱杀螟松的毒性，从而帮助宿主在农药的胁迫下存活（Tago *et al.*, 2015）。茚虫威（Indoxacarb）是一种广泛应用在果蔬生产上的高效杀虫剂，而小菜蛾肠道中的蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* 能够有效水解茚虫威，这使得小菜蛾甚至可以利用这种农药为能源物质，维持其生命活动（Ramya *et al.*, 2016）。植物基于自我保护的目的，能够产生对植食性动物有毒的次级代谢产物。然而特定以这些植物为食的昆虫却不受影响。最近的研究表明，肠道

微生物可以协助宿主降解食入的植物成分中有毒的次级代谢产物。例如,舞毒蛾 *L. dispar* 肠道的不动杆菌属细菌能够降解山杨分泌的对动物有毒性的酚苷类化合物(phenolic glycosides),从而保护其宿主在进食后不受毒性影响(Mason *et al.*, 2016)。一种夜蛾科昆虫——毛健夜蛾 *Brithys crini* 肠道内的克雷伯氏杆菌属和棒状杆菌属 *Corynebacterium* 细菌能够降解生物碱(Vilanova *et al.*, 2016)。毛健夜蛾肠道内的酪黄肠球菌 *E. casseliflavus* 则能够耐受植物分泌的乳胶,因此可能对昆虫的肠道起到保护作用(Vilanova *et al.*, 2016)。

4.2 肠道共生菌参与宿主免疫活动

同样,肠道微生物也参与昆虫的免疫防御系统。与脊椎动物的免疫系统不同,昆虫的免疫系统较为简单。昆虫主要通过体液免疫的方式抵抗外来病原生物的入侵,如昆虫脂肪体内的抗菌肽(antimicrobial peptides, AMPs)和酚氧化酶系参与的一系列氧化反应。在家蚕体内已发现了包括天蚕素(cecropin)、攻击素(attacin)在内的多种抗菌肽(Axen *et al.*, 1997)。这些抗菌肽能够抑制病原微生物的生长,是昆虫体内十分重要的免疫成分。除体液免疫外,昆虫的血淋巴还具有细胞免疫的功能,如吞噬作用、成瘤作用和包囊作用等。这些免疫功能可以将侵入昆虫体内的大体积异物或原生动物包裹起来,降低其对机体的伤害。其他的免疫方式还包括合成花生四烯酸类化合物的各种酶,如磷脂酶A2,这些酶能够参与昆虫的免疫反应。另外还有各种信号通路,如 Toll 通路和 Imd 通路,识别外来的病原生物并触发免疫反应,以保障昆虫免于病害侵染(Satyavathi *et al.*, 2014)。最近研究表明,肠道微生物也能作为昆虫免疫系统中的一道防线,降低病原微生物入侵风险,保护宿主。肠道微生物对宿主的保护机制主要体现在以下几个方面:刺激宿主免疫系统、通过细菌素或其他方式抑制病原菌繁殖。肠道内亚致死量的病原生物能够有效刺激昆虫免疫系统,提高昆虫对病原微生物的防御等级,增加宿主在致死剂量的病原微生物侵染后的存活率(Mikonranta *et al.*, 2014)。肠道微生物也能够通过抑制外来病原微生物繁殖的方式保护宿主,这种机制与肠道的定殖阻力(colonization resistance)机制相关。定殖阻力这个概念早在 20 世纪 60 年代就被提出(Buffie and Pamer, 2013)。经过一系列演化,肠道的定殖阻力现在可以理解为定居在肠道的微生物能够有效抑制病原微生物在肠道的定殖和生长的现象(Lawley and Walker, 2013)。在沙漠蝗虫 *Schistocerca gregaria* 和熊蜂 *Bombus terrestris* 中已经发现,在自然环境下定殖于肠道的共生菌能够有效抑制黏质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* 和熊蜂短膜虫 *Crithidia bombi* 等病原生物对宿主的危害作用(Dillon *et al.*, 2005; Koch and Schmid-Hempel, 2011)。鳞翅目昆虫肠道中也有类似的保护机制,例如:海灰翅夜蛾肠道中稳定定居的蒙氏肠球菌能够分泌细菌素 mundticin,抑制肠球菌属的几种潜在病原菌的定殖(Shao *et al.*, 2017)。白色念珠菌 *Candida albicans* 是一种大蜡螟 *Galleria mellonella* 的致病菌,它可以在大蜡螟肠道形成生物膜,导致寄主死亡。在大蜡螟肠道中发现一种嗜乳酸杆菌 *Lactobacillus acidophilus*,它的存在能够抑制白色念珠菌生物膜的形成,从而保护宿主(Vilela *et al.*, 2015)。

5 小结与展望

综上所述,大量微生物与鳞翅目昆虫共生,并与其宿主协同进化,直接或间接对宿主发挥着重要的作用。对鳞翅目昆虫肠道微生物的研究,不但有利于昆虫资源的开发利用,防治昆虫病害,而且也有利于从昆虫肠道这一特殊环境中获得特殊功能的生物资源,用于开辟生物转化新途径,发展生物质新能源等。为了实现这些目标,仍需解决如下几个问题:

(1)研究手段的局限性导致的误差。在对肠道菌群的研究中,虽然现有的检测手段能较全面地鉴定肠道微生物的种类,但对其所占比例仍受到取样方法、测序引物、分析算法等影响,难以真实还原肠道内微生物组成情况。例如植食性鳞翅目幼虫肠道内的大量植物组织影响肠道微生物组鉴定结果,植物细胞内大量的叶绿体核酸能够被细菌 16S rRNA 基因通用引物扩增,形成大量蓝细菌门(Cyanobacteria)微生物序列,降低测序质量。Hanshew 等(2013)设计了能够减小叶绿体影响的测序引物,但对不同植物组织的测试发现,这些引物的扩增效率不一(Beckers *et al.*, 2016)。引物扩增效率的差异极易导致测序结果中菌种分布信息的偏差。

(2)外源性微生物、核酸污染。微生物在生物圈内无所不在,实验室环境、实验器材、实验操作人员本身都可能携带大量微生物。在捕捉、繁育、饲喂昆虫中,这些微生物极可能随着接触或饲喂过程进

入昆虫肠道，被误认为是定殖于肠道中的昆虫共生菌。核酸提取也会影响结果的准确性，如果采用遭到污染的试剂盒提取核酸，会造成结果混乱。商品化核酸提取试剂盒受到军团杆菌属 *Legionella* 等细菌污染已有报道(Evans *et al*., 2003)。此外，不同提取方法导致核酸质量参差不齐，因此产生测序误差，难以提供准确信息。

(3)肠道菌群的动态变化。肠道菌群随着宿主的饮食、健康情况、发育周期，甚至宿主性别产生变化(Markle *et al*., 2013; Liang *et al*., 2014; Ojeda *et al*., 2015; 李振等, 2016; 徐阳等, 2016; Chen *et al*., 2016)，这些提高了研究难度。除了宿主影响，微生物间也存在复杂的相互作用。例如，一些肠道细菌分泌的细菌素能够抑制其他微生物生长，从而影响肠道内菌群分布(Kommineni *et al*., 2015)。目前多数针对昆虫肠道微生物的研究将肠道菌群视为一个整体，无法确定产生影响的具体微生物种属。虽然利用无菌昆虫能够明确特定菌种的作用(Tounou *et al*., 2008)，但当处于复杂自然环境中时，这些实验结果是否重现也未可知。此外，一些非优势菌种也可能在宿主的肠道中具有十分重要的功能(Rolig *et al*., 2015)。因此，肠道中低丰度的共生菌也亟待进行相应的研究。

总而言之，鳞翅目昆虫肠道微生物的研究尚处于较初步的阶段，目前，仅探明了少数鳞翅目农林害虫和经济昆虫的肠道微生物组成。对于特定菌种的功能及其在肠道内的定殖能力、定殖时间和位置仍在继续探索中。为了取得更加深入的研究进展，还需国内外研究者共同努力。Pyro-SIP 先进技术的运用为研究肠道菌群复杂的代谢功能提供了一个新的解决方案。结合全基因组、转录组测序，能够更加精准地探究核心肠道微生物与宿主间的相互作用。

参考文献(References)

Alberoni D, Gaggia F, Baffoni L, Di Gioia D, 2016. Beneficial microorganisms for honey bees: problems and progresses. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 100(22): 9469–9482.

Anand AA, Vennison SJ, Sankar SG, Prabhu DI, Vasan PT, Raghuraman T, Geoffrey CJ, Vendan SE, 2010. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *J. Insect Sci*., 10: 107.

Appel HM, Martin MM, 1990. Gut redox conditions in herbivorous lepidopteran larvae. *J. Chem. Ecol*., 16(12): 3277–3290.

Axen A, Carlsson A, Engstrom A, Bennich H, 1997. Gloverin, an antibacterial protein from the immune hemolymph of *Hyalophora* pupae. *Eur. J. Biochem*., 247(2): 614–619.

Barbehenn RV, Martin MM, 1994. Tannin sensitivity in larvae of *Malacosoma disstria* (Lepidoptera): roles of the peritrophic envelope and midgut oxidation. *J. Chem. Ecol*., 20: 1985–2001.

Beckers B, De Beeck MO, Thijs S, Truyens S, Weyens N, Boerjan W, Vangronsveld J, 2016. Performance of 16S rDNA primer pairs in the study of rhizosphere and endosphere bacterial microbiomes in metabarcoding studies. *Front. Microbiol*., 7: 650.

Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL, 2006. GenBank. *Nucl. Acid. Res*., 34(Suppl. 1): D16–D20.

Berebaum M, 1980. Adaptive significance of midgut pH in larval Lepidoptera. *Am. Nat*., 115(1): 138–146.

Berenbaum M, Jan, 1980. The American Naturalist. The University of Chicago Press. Chicago, IL.

Berlanga M, 2015. Functional symbiosis and communication in microbial ecosystems. The case of wood-eating termites and cockroaches. *Int. Microbiol*., 18(3): 159–169.

Bing XL, Yang J, Zchori-Fein E, Wang XW, Liu SS, 2013. Characterization of a newly discovered symbiont of the whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Appl. Environ. Microbiol*., 79(2): 569–575.

Boukedi H, Ben Khedher S, Hadhri R, Jaoua S, Tounsi S, Abdelkefi-Mesrati L, 2017. Vegetative insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* BLB459 and its efficiency against Lepidoptera. *Toxicon*, 129: 89–94.

Brinkmann N, Martens R, Tebbe CC, 2008. Origin and diversity of metabolically active gut bacteria from laboratory-bred larvae of *Manduca sexta* (Sphingidae, Lepidoptera, Insecta). *Appl. Environ. Microbiol*., 74(23): 7189–7196.

Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, Handelsman J, 2004. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol*., 70(1): 293–300.

Brune A, Dietrich C, 2015. The gut microbiota of termites: digesting the diversity in the light of ecology and evolution. *Annu. Rev. Microbiol*., 69: 145–166.

Buffie CG, Pamer EG, 2013. Microbiota-mediated colonization resistance against intestinal pathogens. *Nat. Rev. Immunol*., 13(11): 790–801.

Chen B, Teh BS, Sun C, Hu S, Lu X, Boland W, Shao Y, 2016. Biodiversity and activity of the gut microbiota across the life history of theinsect herbivore *Spodoptera littoralis*. *Sci. Rep*., 6: 29505.

Dantur KI, Enrique R, Welin B, Castagnaro AP, 2015. Isolation of cellulolytic bacteria from the intestine of *Diatraea saccharalis* larvae and evaluation of their capacity to degrade sugarcane biomass. *AMB Express*, 5: 15.

Darvishzadeh A, Hosseininaveh V, Salimian SR, 2014. Enzymatic activity of alpha-amylase in alimentary tract *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae): characterization and compartmentalization. *Arthropods*, 3(3): 138–146.

Dillon RJ, Vennard CT, Buckling A, Charnley AK, 2005. Diversity of

locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol. Lett.*, 8 (12): 1291 – 1298.

Diouf M, Roy V, Mora P, Frechault S, Lefebvre T, Herve V, Rouland-Lefevre C, Miambi E, 2015. Profiling the succession of bacterial communities throughout the life stages of a higher termite *Nasutitermes arborum* (Termitidae, Nasutitermitinae) using 16S rRNA gene pyrosequencing. *PLoS ONE*, 10(10): e0140014.

Dow JA, 1992. pH gradients in lepidopteran midgut. *J. Exp. Biol.*, 172 (Pt 1): 355 – 375.

Engel P, Moran NA, 2013. The gut microbiota of insects-diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37(5): 699 – 735.

Evans GE, Murdoch DR, Anderson TP, Potter HC, George PM, Chambers ST, 2003. Contamination of Qiagen DNA extraction kits with Legionella DNA. *J. Clin. Microbiol.*, 41(7): 3452 – 3453.

Gao XY, Tian JC, Chen Y, Hu C, Peng YF, Ye GY, 2008. Impact evaluation of transgenic *cry1Ab* japonica rice on the diversity of intestinal microbial community in the brown planthopper *Nilaparvata lugens* using Biolog-Eco method. *J. Plant Protect.*, 35(4): 327 – 331. [高秀云, 田俊策, 陈洋, 胡萃, 彭于发, 叶恭银, 2008. Biolog-Eco 方法检测转 *cry1Ab* 粳稻对褐飞虱肠道微生物多样性的影响. 植物保护学报, 35(4): 327 – 331]

Gomes FM, Carvalho DB, Machado EA, Miranda K, 2013. Ultrastructural and functional analysis of secretory goblet cells in the midgut of the lepidopteran *Anticarsia gemmatalis*. *Cell Tissue Res.*, 352(2): 313 – 326.

Grayson JM, 1951. Acidity-alkalinity in the alimentary canal of twenty insect species. *Va. J. Sci.*, 2: 46 – 59.

Gross EM, Brune A, Walenciak O, 2008. Gut pH, redox conditions and oxygen levels in an aquatic caterpillar: potential effects on the fate of ingested tannins. *J. Insect Physiol.*, 54(2): 462 – 471.

Guarner F, Malagelada JR, 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361(9356): 512 – 519.

Hanshew AS, Mason CJ, Raffa KF, Currie CR, 2013. Minimization of chloroplast contamination in 16S rRNA gene pyrosequencing of insect herbivore bacterial communities. *J. Microbiol. Methods*, 95 (2): 149 – 155.

He C, Nan X, Zhang Z, Li M, 2013. Composition and diversity analysis of the gut bacterial community of the oriental armyworm, *Mythimna separata*, determined by culture-independent and culture-dependent techniques. *J. Insect Sci.*, 13: 165.

Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U, 2009. New Insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu. Rev. Entomol.*, 54: 285 – 302.

Heimpel AM, 1955. The pH in the gut and blood of the larch sawfly *Pristiphora erichsonii* (Hfg) and other insects with respect to the pathogenicity of *Bacillus cereus* Fr. and Fr. Can. *J. Zool.*, 33: 99 – 106.

Hernandez N, Escudero JA, San Millan A, Gonzalez-Zorn B, Lobo JM, Verdu JR, Suarez M, 2015. Culturable aerobic and facultative bacteria from the gut of the polyphagic dung beetle *Thorectes lusitanicus*. *Insect Sci.*, 22(2): 178 – 190.

Hu X, Chen L, Xiang X, Yang R, Yu S, Wu X, 2012. Proteomic analysis of peritrophic membrane (PM) from the midgut of fifth-instar larvae, *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Rep.*, 39 (4): 3427 – 3434.

Husband R, Herre EA, Turner SL, Gallery R, Young JP, 2002. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. *Mol. Ecol.*, 11(12): 2669 – 2678.

Johnson KS, Barbehenn RV, 2000. Oxygen levels in the gut lumens of herbivorous insects. *J. Insect Physiol.*, 46(6): 897 – 903.

Kanehisa M, Goto S, 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucl. Acid. Res.*, 28(1): 27 – 30.

Koch H, Schmid-Hempel P, 2011. Socially transmitted gut microbiota protect bumble bees against an intestinal parasite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(48): 19288 – 19292.

Kommineni S, Bretl DJ, Lam V, Chakraborty R, Hayward M, Simpson P, Cao YM, Bousounis P, Kristich CJ, Salzman NH, 2015. Bacteriocin production augments niche competition by enterococci in the mammalian gastrointestinal tract. *Nature*, 526(7575): 719 – 722.

Kuraishi T, Binggeli O, Opota O, Buchon N, Lemaitre B, 2011. Genetic evidence for a protective role of the peritrophic matrix against intestinal bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(38): 15966 – 15971.

Lawley TD, Walker AW, 2013. Intestinal colonization resistance. *Immunology*, 138(1): 1 – 11.

LeBlanc JG, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M, 2013. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 24 (2): 160 – 168.

Lehane MJ, 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annu. Rev. Entomol.*, 42: 525 – 550.

Li Z, Han LZ, Liu YD, Hou ML, 2016. Change in the diversity of bacterial community in larval midguts of the striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Crambidae), after treatment with *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *Acta Entomol. Sin.*, 59 (3): 292 – 300. [李振, 韩兰芝, 刘玉娣, 侯茂林, 2016. Bt 杀虫蛋白处理后二化螟幼虫中肠细菌群落的变化. 昆虫学报, 59 (3): 292 – 300]

Liang X, Fu Y, Tong L, Liu H, 2014. Microbial shifts of the silkworm larval gut in response to lettuce leaf feeding. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 98(8): 3769 – 3776.

Lin XL, Pan QJ, Tian HG, Douglas AE, Liu TX, 2015. Bacteria abundance and diversity of different life stages of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), revealed by bacteria culture-dependent and PCR-DGGE methods. *Insect Sci.*, 22(3): 375 – 385.

Liu H, Chen BS, Hu SR, Liang XL, Lu X, Shao YQ, 2016. Quantitative proteomic analysis of germination of *Nosema bombycis* spores under extremely alkaline conditions. *Front. Microbiol.*, 7: 1459.

Liu N, Yan X, Zhang M, Xie L, Wang Q, Huang Y, Zhou X, Wang S, Zhou Z, 2011. Microbiome of fungus-growing termites: a new reservoir for lignocellulase genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77

(1): 48-56.

Liu XG, Yang YJ, Liao QJ, Xu HX, Liu YH, Lv ZX, 2016. Analysis of the bacterial community structure and diversity in the intestine of *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(9): 965-976. [刘小改, 杨亚军, 廖秋菊, 徐红星, 刘映红, 吕仲贤, 2016. 稻纵卷叶螟肠道细菌群落结构与多样性分析. 昆虫学报, 59(9): 965-976]

Lohan OP, 1980. Cell wall constituents and *in vitro* DM digestibility of some fodder tress in Himachal Pradesh. *Forage Research*, (6): 21-28.

Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM, Henrissat B, 2014. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucl. Acid. Res.*, 42(Database Issue): D490-D495.

Mason CJ, Lowe-Power TM, Rubert-Nason KF, Lindroth RL, Raffa KF, 2016. Interactions between bacteria and aspen defense chemicals at the phyllosphere-herbivore interface. *J. Chem. Ecol.* 42: 193-201.

Markle JGM, Frank DN, Mortin-Toth S, Robertson CE, Feazel LM, Rolle-Kampczyk U, von Bergen M, McCoy KD, Macpherson AJ, Danska JS, 2013. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science*, 339 (6123): 1084-1088.

Mercer EH, Day MF, 1952. The fine structure of the peritrophic membranes of certain insects. *Biol. Bull.*, 103(3): 384-394.

Mikaelyan A, Kohler T, Lampert N, Rohland J, Boga H, Meuser K, Brune A, 2015. Classifying the bacterial gut microbiota of termites and cockroaches: a curated phylogenetic reference database (DictDb). *Syst. Appl. Microbiol.*, 38(7): 472-482.

Mikonranta L, Mappes J, Kaukoniitty M, Freitak D, 2014. Insect immunity: oral exposure to a bacterial pathogen elicits free radical response and protects from a recurring infection. *Front. Zool.*, 11 (1): 23.

Mint Mohamed Lemine A, Ould Lemrabott MA, Hasni Ebou M, Mint Lekweiry K, Ould Ahmedou Salem MS, Ould Brahim K, Ouldabdallahi Moukah M, Ould Bouraya IN, Brengues C, Trape JF, Basco L, Bogreau H, Simard F, Faye O, Ould Mohamed Salem Boukhary A, 2017. Mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Mauritania: a review of their biodiversity, distribution and medical importance. *Parasit. Vectors*, 10(1): 35.

Mohmed AA, Ansari MJ, Al-Ghamdi A, Mohamed MO, Kaur M, 2014. Effect of larval nutrition on the development and mortality of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Rev. Colomb. Entomol.*, 40 (1): 49-59.

Narayanan K, Jayaraj S, 1974. The effect *of Bacillus thuringensis* endotoxin on hemolymph cation levels in the citrus leaf caterpillar *Papilio demoleus*. *J. Invert. Pathol.*, 23: 125-126.

Narayanan K, Jayaraj S, Govindarajan R, 1976. Further observations on the mode of action of *Bacillus thuringensis* on *Papilio demoleus* and *Spodoptera litura*. *J. Invert. Pathol.*, 28: 269-270.

O'Hara AM, Shanahan F, 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.*, 7(7): 688-693.

Ojeda P, Bobe A, Dolan K, Leone V, Martinez K, 2015. Nutritional modulation of gut microbiota - the impact on metabolic disease pathophysiology. *J. Nutr. Biochem.*, 28: 191-200.

Pilon FM, Visotto LE, Guedes RN, Oliveira MG, 2013. Proteolytic activity of gut bacteria isolated from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. *J. Comp. Physiol. B*, 183(6): 735-747.

Priya NG, Ojha A, Kajla MK, Raj A, Rajagopal R, 2012. Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE*, 7(1): e30768.

Radajewski S, Ineson P, Parekh NR, Murrell JC, 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 403(6770): 646-649.

Ramya SL, Venkatesan T, Srinivasa Murthy K, Jalali SK, Verghese A, 2016. Detection of carboxylesterase and esterase activity in culturable gut bacterial flora isolated from diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus), from India and its possible role in indoxacarb degradation. *Braz. J. Microbiol.*, 47(2): 327-336.

Richards AG, Richards PA, 1977. The peritrophic membranes of insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 22: 219-240.

Robinson GE, Hackett KJ, Purcell-Miramontes M, Brown SJ, Evans JD, Goldsmith MR, Lawson D, Okamuro J, Robertson HM, Schneider DJ, 2011. Creating a buzz about insect genomes. *Science*, 331 (6023): 1386.

Rolig AS, Parthasarathy R, Burns AR, Bohannan BJM, Guillemin K, 2015. Individual members of the microbiota disproportionately modulate host innate immune responses. *Cell Host & Microbe*, 18 (5): 613-620.

Rossmassler K, Dietrich C, Thompson C, Mikaelyan A, Nonoh JO, Scheffrahn RH, Sillam-Dusses D, Brune A, 2015. Metagenomic analysis of the microbiota in the highly compartmented hindguts of six wood- or soil-feeding higher termites. *Microbiome*, 3: 56.

Rousk J, Brookes PC, Baath E, 2009. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(6): 1589-1596.

Satyavathi VV, Minz A, Nagaraju J, 2014. Nodulation: an unexplored cellular defense mechanism in insects. *Cell. Signal.*, 26 (8): 1753-1763.

Shao Y, Arias-Cordero E, Guo H, Bartram S, Boland W, 2014. *In vivo* Pyro-SIP assessing active gut microbiota of the cotton leafworm, *Spodoptera littoralis*. *PLoS ONE*, 9(1): e85948.

Shao YQ, Chen BS, Sun C, Ishida K, Hertweck C, Boland W, 2017. Symbiont-derived antimicrobials contribute to the control of the lepidopteran gut microbiota. *Cell Chem. Biol.*, 24(1): 66-75.

Sklarz MY, Angel R, Gillor O, Soares MI, 2009. Evaluating amplified rDNA restriction analysis assay for identification of bacterial communities. *Antonie van Leeuwenhoek*, 96(4): 659-664.

Spencer KC, 1988. Chemical mediation of coevolution in the *Passiifora heliconius* interaction. In: Spencer KC ed. Chemical Mediation of Coevolution. Academic Press, London. 167-200.

Srivastava AK, Krishna KK, 1976. Studies on the utilisation of food in the larva of the rice moth *Corcyra cephalonica*. I. Hydrogen ion concentration of the gut contents of the larva. *Z. Angew. Zool.*, 63: 71-76.

Srivastava BK, Mathur LML, 1966. On the hydrogen-ion concentration in the alimentary canal and blood of phytophagous Lepidoptera. *Ind. J. Entomol.*, 28: 422 – 426.

Sun Z, Lu Y, Zhang H, Kumar D, Liu B, Gong Y, Zhu M, Zhu L, Liang Z, Kuang S, Chen F, Hu X, Cao G, Xue R, Gong C, 2016. Effects of BmCPV infection on silkworm *Bombyx mori* Intestinal bacteria. *PLoS ONE*, 11(1): e0146313.

Tang M, Lv L, Jing SL, Zhu LL, He GC, 2010. Bacterial symbionts of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, 76(6): 1740 – 1745.

Tang X, Freitak D, Vogel H, Ping L, Shao Y, Cordero EA, Andersen G, Westermann M, Heckel DG, Boland W, 2012. Complexity and variability of gut commensal microbiota in polyphagous lepidopteran larvae. *PLoS ONE*, 7(7): e36978.

Tago K, Kikuchi Y, Nakaoka S, Katsuyama C, Hayatsu M, 2015. Insecticide applications to soil contribute to the development of *Burkholderia* mediating insecticide resistance in stinkbugs. *Mol. Ecol.*, 24: 3766 – 3778.

Tatusov RL, Koonin EV, Lipman DJ, 1997. A genomic perspective on protein families. *Science*, 278(5338): 631 – 637.

Terra WR, C. Ferreira, Bianchi AGd, 1979. Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. *J. Insect Physiol.*, 25(6): 487 – 494.

Thakur A, Dhammi P, Saini HS, Kaur S, 2015. Pathogenicity of bacteria isolated from gut of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) and fitness costs of insect associated with consumption of bacteria. *J. Invertebr. Pathol.*, 127: 38 – 46.

Torsvik V, Goksoyr J, Daae FL, 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(3): 782 – 787.

Tounou AK, Kooyman C, Douro-Kpindou OK, Poehling HM, 2008. Interaction between *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, two pathogens of the desert locust, *Schistocerca gregaria* under laboratory conditions. *J. Invertebr. Pathol.*, 97(3): 203 – 210.

Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, Fouts DE, Levy S, Knap AH, Lomas MW, Nealson K, White O, Peterson J, Hoffman J, Parsons R, Baden-Tillson H, Pfannkoch C, Rogers YH, Smith HO, 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304(5667): 66 – 74.

Vilanova C, Baixeras J, Latorre A, Porcar M, 2016. The generalist inside the specialist: gut bacterial communities of two insect species feeding on toxic plants are dominated by *Enterococcus* sp. *Front. Microbiol.*, 7: 1005.

Vilela SF, Barbosa JO, Rossoni RD, Santos JD, Prata MC, Anbinder AL, Jorge AO, Junqueira JC, 2015. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 inhibits biofilm formation by *C. albicans* and attenuates the experimental candidiasis in *Galleria mellonella*. *Virulence*, 6(1): 29 – 39.

Wang HX, Geng ZL, Zeng Y, Shen YM, 2008. Enriching plant microbiota for a metagenomic library construction. *Environ. Microbiol.*, 10(10): 2684 – 2691.

Wang P, Granados RR, 2001. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 47(2): 110 – 118.

Waterhouse DF, 1949. The hydrogen ion concentration in the alimentary canal of larval and adult Lepidoptera. *Aust. J. Sci. Res. Ser. B, Biol. Sci.*, 132: 428 – 437.

Xia X, Zheng D, Zhong H, Qin B, Gurr GM, Vasseur L, Lin H, Bai J, He W, You M, 2013. DNA sequencing reveals the midgut microbiota of diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and a possible relationship with insecticide resistance. *PLoS ONE*, 8(7): e68852.

Xiang H, Wei GF, Jia SH, Huang JH, Miao XX, Zhou ZH, Zhao LP, Huang YP, 2006. Microbial communities in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Can. J. Microbiol.*, 52(11): 1085 – 1092.

Xie W, Meng QS, Wu QJ, Wang SL, Yang X, Yang NN, Li RM, Jiao XG, Pan HP, Liu BM, Su Q, Xu BY, Hu SN, Zhou XG, Zhang YJ, 2012. Pyrosequencing the *Bemisia tabaci* transcriptome reveals a highly diverse bacterial community and a robust system for insecticide resistance. *PLoS ONE*, 7(4): e35181.

Xu Y, Nan XN, Wei Z, He H, 2016. Seasonal characteristics of gut bacterial communities associated with carpenter ant *Camponotus japonicus* (Hymenoptera: Formicidae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(6): 632 – 640. [徐阳,南小宁, 魏琮, 贺虹, 2016. 日本弓背蚁肠道细菌群落的季节特征. 昆虫学报, 59(6): 632 – 640]

Yang J, Yang Y, Wu WM, Zhao J, Jiang L, 2014. Evidence of polyethylene biodegradation by bacterial strains from the guts of plastic-eating waxworms. *Environ. Sci. Technol.*, 48(23): 13776 – 13784.

Zhong X, Zhang L, Zou Y, Yi Q, Zhao P, Xia Q, Xiang Z, 2012. Shotgun analysis on the peritrophic membrane of the silkworm *Bombyx mori*. *BMB Rep.*, 45(11): 665 – 670.

(责任编辑: 马丽萍)